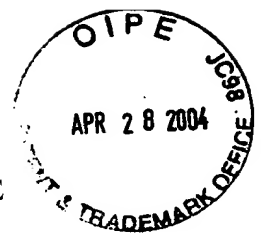


Imale



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Nicole DUSCH, et al.

GAU: 1645

SERIAL NO: 09/965,825

EXAMINER:

FILED: October 1, 2001

FOR: PROCESS FOR THE FERMENTATIVE PREPARATION OF D-PANTOTHENIC ACID USING CORYNEFORM BACTERIA

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number _____, filed _____, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. Date Filed

☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 48 604.5	September 30, 2000
GERMANY	101 17 085.8	April 6, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. _____ filed _____
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number _____
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. _____ filed _____; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s) _____
☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Corwin Paul Umbach

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 48 604.5

Anmeldetag: 30. September 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-
Pantothensäure unter Verwendung coryneformer
Bakterien

IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 7. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien in denen das poxB-Gen abgeschwächt ist.

Stand der Technik

Die Pantothensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung findet.

Pantothensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt, D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und so die gewünschte D-Pantothensäure erhalten.

Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form, die frei von L-Pantothensäure ist.

Verschiedene Arten von Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*), *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z.B. *Debaromyces castellii* können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothensäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *E. coli* durch Amplifikation von Pantothensäure-Biosynthesegenen aus *E.*

coli, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothensäure verbessert wird.

- 5 EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von E. coli Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten, wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin
- 10 und α -Ketoisovaleriansäure tragen. Sie produzieren in einer Nährlösung, die Glucose enthält, Pantoinsäure, und in einer Glucose- und β -Alanin-haltigen Nährlösung D-Pantothensäure. In EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation der
- 15 Pantothensäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in glucosehaltigen Nährlösungen, die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, die Produktion von D-Pantothensäure verbessert wird.
- 20 Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) sind in der Literatur nur ansatzweise bekannt. So berichten Sahm und Eggeling (Applied and Environmental Microbiology 65(5), 1973-1979 (1999)) über den Einfluss der Überexpression der
- 25 Gene panB und panC und Dusch et al. (Applied and Environmental Microbiology 65(4), 1530-1539 (1999)) über den Einfluß des Gens panD auf die Bildung der D-Pantothensäure.

Aufgabe der Erfindung

- 30 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pantothensäure mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Wenn im Folgenden D-Pantothensäure oder Pantothensäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothensäure wie
5 z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen die für das
10 Enzym Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB-Gen) abgeschwächt wird.

Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure in dem folgende Schritte durchführt werden:

- 15 a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen zumindest die für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB) abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird;
- 20 b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung der produzierten D-Pantothensäure.

Die eingesetzten Stämme produzieren gegebenenfalls bereits vor der Abschwächung des poxB-Gens D-Pantothensäure.

25 Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende

Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können D-Pantothensäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter coryneformer Bakterien, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- 20 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte, D-Pantothensäure produzierende Mutanten wie beispielsweise

- 25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ ilvA/pEC7panBC
- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pND-D2

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden poxB-Gens in verbesserter Weise Pantothensäure produzieren.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- 5 Die Nukleotidsequenz des poxB-Gens ist in der SEQ ID No. 1 und die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz des Enzymproteins in SEQ ID No. 2 dargestellt.

Das in der SEQ ID No. 1 beschriebene poxB-Gen kann erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele
10 des poxB-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben.

Eine neue, in SEQ ID No. 6 dargestellte Nukleotidsequenz
15 wurde gefunden, die stromaufwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz der poxB-Genregion liegt. Weiterhin wurde eine neue, in SEQ ID No. 7 dargestellte Nukleotidsequenz gefunden, die stromabwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz der poxB-Genregion
20 liegt. Auf diese Weise wurde die in SEQ ID No. 4 dargestellte Sequenz der poxB-Genregion erhalten.

Es wurde gefunden, daß diese Polynukleotide dargestellt in SEQ ID No. 6 und 7, nützlich sind in der Herstellung von Mutanten mit abgeschwächtem, insbesondere ausgeschaltetem
25 poxB-Gen.

Es wurde auch gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des poxB-Gens in verbesserter Weise Pantothensäure produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung kann entweder die
30 Expression des poxB-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung („Mutation“) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind

5 beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei

10 Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem

15 Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der

20 katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762

25 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen

30 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,

35 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von

der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens
5 einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem
10 vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
15 Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen eine
20 Insertionsmutagenese des *poxB*-Gens durchgeführt werden kann, ist pCR2.1poxBint (Figur 1).

Plasmid pCR2.1poxBint besteht aus dem von Mead et al. (Bio/Technology 9:657-663 (1991)) beschriebenen Plasmid pCR2.1-TOPO, in das ein internes Fragment des *poxB*-Gens,
25 dargestellt in SEQ-ID No. 3, eingebaut wurde. Dieses Plasmid führt nach Transformation und homologer Rekombination in das chromosomale *poxB*-Gen (Insertion) zu einem Totalverlust der Enzymfunktion.

Ein anderes Beispiel für ein mutiertes *poxB*-Gen ist das in
30 Plasmid pCRB1-poxBdel (Figur 2) enthaltene Δ poxB-Allel. Das Δ poxB-Allel enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke des *poxB*-Gens. Der 1737 bp lange Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Nukleotidsequenz des Δ poxB-Allels bzw. der 5'- und der 3'-Flanke ist in der SEQ ID No. 12
35 dargestellt. Dieses Δ poxB-Allel kann durch

Integrationsmutagenese in coryneforme Bakterien eingebaut werden. Hierzu bedient man sich des oben angegebenen Plasmides pCRB1-poxBdel oder überführt das ApoxB-Allel in das Plasmid pK18mobsacB und verwendet das dabei entstehende
5 Plasmid vom Typ pK18mobsacBpoxBdel. Nach Übertragung durch Konjugation oder Transformation und homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross over“-Ereignisses und eines zweiten, eine Excision bewirkenden „cross over“-Ereignisses im poxB-Gen erreicht man den
10 Einbau des ApoxB-Allels und erzielt einen Totalverlust der Enzymfunktion in dem jeweiligen Stamm. Das durch SEQ ID No. 12 charakterisierte ApoxB-Allel ist Gegenstand der Erfindung.

Anleitungen und Erläuterungen zur Insertionsmutagenese bzw.
15 Integrationsmutagenese und Genaustausch findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,84-87 (1991)), Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915-927 (1998)) oder Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)).

20 Weiterhin kann es für die Produktion von Pantothenensäure vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase
25 kodierende panB-Gen (Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology, 65, 1973-1979 (1999)),
- das für die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen (Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology, 65, 1973-1979 (1999)),
- 30 • das für die Acetohydroxysäure Isomeroreduktase kodierende ilvC-Gen (EMBL-GenBank: Accession Nr. L09232), und

- das für die Dihydroxysäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen (EP-A-1006189);

zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Weiterhin kann es für die Produktion von Pantothensäure vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gens das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) kodierende pck-Gen (DE: 19950409.1, DSM 13047) abzuschwächen.

Schließlich kann es für die Produktion von Pantothensäure vorteilhaft sein, neben der Abschwächung der Pyruvat-Oxidase unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982), die die Produktion der Pantothensäure vermindern.

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothensäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer

Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
5 Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen.

Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenerer Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- 10 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
15 Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
20 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 25 Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum
30 notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe, wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothersäure-Produktion Vorstufen der Pantothersäure, wie

Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure, und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in
5 geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in
10 geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, z.B.
15 Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
20 Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Konzentration an gebildeter Pantothensäure kann mit bekannten chemischen (Velisek; Chromatographic Science 60,
25 515-560 (1992)) oder mikrobiologischen Verfahren wie z.B. dem Lactobacillus plantarum Test (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA) bestimmt werden.

Folgender Mikroorganismus wurde am 19. Oktober 1999 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen
30 und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm DH5 α /pCR2.1poxBint als DSM 13114.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus

5 Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung 10 Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) 15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma 20 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) 25 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. 25 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) 30 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic

Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

10 Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des poxB-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg,

Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1737 Basenpaaren, welches als poxB-Gen bezeichnet wurde. Das poxB-Gen kodiert für ein Polypeptid von 579 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID No. 2.

Beispiel 3

Herstellung des Integrationsvektors pCR2.1poxBint für die Mutagenese des poxB-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von
5 Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994))
chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für
C. glutamicum bekannten Sequenz des poxB-Gens wurden die
folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion
ausgewählt:

10 poxBint1:
5' TGC GAG ATG GTG AAT GGT GG 3'
poxBint2:
5' GCA TGA GGC AAC GCA TTA GC 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech
15 (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A
Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press)
mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion
durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde
20 ein ca. 0,9 kb großen DNA-Fragment isoliert, welches ein
internes Fragment des poxB-Gens trägt und in der SEQ ID No.
3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA
Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA,
25 USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO
(Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.
Anschließend wurde der E. coli Stamm Top10F' (Grant et al.
(1990) Proceedings of the National Academy of Sciences,
USA, 87:4645-4649) elektroporiert. Die Selektion von
30 Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des
Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,

1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1poxBint (Figur 1) genannt.

Beispiel 4

Herstellung eines Austauschvektors für die Deletionsmutagenese des poxB-Gens

10 4.1 Bestimmung der Nukleotidsequenz der Flanken des poxB-Gens

In weiteren Sequenzierschritten wurde die Nukleotidsequenz der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion um jeweils ca. 500 bis 600 bp stromaufwärts und stromabwärts erweitert. Hierzu wurde die in Beispiel 2 beschriebene Methodik angewendet. Auf diese Weise wurde die in SEQ ID No. 4 dargestellte, erweiterte Nukleotidsequenz der poxB-Genregion erhalten. Die neue stromaufwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion ist in SEQ ID No. 6 dargestellt. Die neue stromabwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion ist in SEQ ID No. 7 dargestellt.

4.2 Konstruktion eines Δ poxB-Allels

Für die Konstruktion des Δ poxB-Allels wurde die von Horton (Molecular Microbiology 3:93-99 (1995)) beschriebene Methode der GenSOEing-PCR angewendet. Hierfür wurden die in der Tabelle 1 angegebenen Primerpaare (Siehe auch SEQ ID No. 8 bis 11) konstruiert. Mittels einer PCR wurde mit dem Primerpaar 1 der 5'-Bereich vor dem poxB-Gen und mit dem Primerpaar 2 der 3'-Bereich hinter dem poxB-Gens amplifiziert. Eine weitere PCR wurden dann mit den beiden Amplifikaten und den Primern pox-del1 und pox-del4 durchgeführt, wodurch mittels GenSOEing die beiden

Amplifikate verbunden wurden. Das so erhaltene Deletionsfragment bzw. Δ poxB-Allel enthält die flankierenden Sequenzen des poxB-Gens. Die Nukleotidsequenz des Δ poxB-Allels ist in SEQ ID No. 12 angegeben.

5

Tabelle 1

Primer	5'-Sequenz-3'	Primerpaar
pox-del1	ATGAGGAACATCCGGCGGTG	1
pox-del2	GAGAACAGCAGGAGTATCAATCATCACTGAACT CCTCAACGTTATGGC	
pox-del3	TGATGATTGATACACCTGCTGTTCTC	2
pox-del4	TCATTGCCACCTGCTTCTCA	

4.3 Konstruktion eines Austauschvektors

Das so erhaltene DNA Fragment wurde mit dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K2800-20) in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO Vektor (Shuman et al., (1994) Journal of Biological Chemistry 269:32678-32684; Bernard et al., (1983) Journal of Molecular Biology 234:534-541) ligiert. Anschließend wurde der E. coli Stamm Top10 (Grant et al. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%)

überprüft. Das Plasmid wurde pCRB1-poxBdel (Figur 2) genannt.

Aus diesem Plasmid wurde das Δ poxB-Allel tragende Insert mittels EcoRI herausgespalten, aus dem Gel isoliert und in
5 den ebenfalls EcoRI-gespaltenen, nicht-replikativen Integrationsvektor pK18mobsacB (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)) ligiert. Die Klonierungen wurden in E. coli DH5 α mc^r (Grant et al., (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87: 4645-4649) als Wirt
10 durchgeführt. Das resultierende Plasmid wurde als pK18mobsacB-poxBdel bezeichnet.

Folgende Figuren sind beigelegt:

- Figur 1: Karte des Plasmides pCR2.1poxBint
- Figur 2: Karte des Plasmides pCRB1-poxBdel

15 Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

20 Figur 1:

ApR	Ampicillin-Resistenzgen
ColE1 ori	Replikationsursprung ColE1
f1 ori	Replikationsursprung des Phagen f1
KmR	Kanamycin-Resistenzgen
lacZ	Reste des lacZ α -Genfragmentes
poxBint	internes Fragment des poxB-Gens

Figur 2:

'lacZa	3'-Ende des lacZ α -Genfragmentes
3'-Region	3'-Flanke des poxB-Gens
5'-Region	5'-Flanke des poxB-Gens
ccdB	ccdB-Gen
Km	Kanamycin-Resistenzgen
lacZa'	5'-Ende des lacZ α -Genfragmentes
plac	Promotor des lac-Operons
pMB1	Replikationsursprung des Plasmids pMB1
Zeocin	Zeocin-Resistenzgen

Darüberhinaus wurden folgende Abkürzungen verwendet:

BamHI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys BamHI
ClaI	Schnittstelle des Restriktionsenzymys ClaI
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI
HindIII:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys HindIII
Sall:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys Sall

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG
 5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
 D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer
 Bakterien.
 <130> 000439 BT
 10 <140>
 <141>
 <160> 12
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 2160
 20 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (327)..(2063)
 <220>
 <221> -35_signal
 <222> (227)..(232)
 30 <220>
 <221> -10_signal
 <222> (256)..(261)
 35 <400> 1
 ttagaggcga ttctgtgagg tcaactttttg tggggctcggg gtctaaattt ggccagtttt 60
 cgaggcgacc agacaggcgt gcccacgatg tttaaataagg cgatcgggtgg gcatctgtgt 120
 40 ttggtttcga cgggctgaaa ccaaaccaga ctgcccagca acgacggaaa tcccaaaagt 180
 gggcatccct gtttggtacc gagtaccac ccgggcctga aactccctgg caggcgggog 240
 aagcgtggca acaactggaa tttaagagca caattgaagt cgcaccaagt taggcaacac 300
 45 aatagccata acgttgagga gttcag atg gca cac agc tac gca gaa caa tta 353
 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu
 1 5
 50 att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg 401
 Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val
 10 15 20 25
 ggt gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att 449
 55 Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile
 30 35 40

		gag	tgg	gtg	cac	gtt	cga	aat	gag	gaa	gcg	gcg	gcg	ttt	gca	gcc	ggt	497
		Glu	Trp	Val	His	Val	Arg	Asn	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	
					45					50					55			
5		gcg	gaa	tcg	ttg	atc	act	ggg	gag	ctg	gca	gta	tgt	gct	gct	tct	tgt	545
		Ala	Glu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Glu	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Ala	Ser	Cys	
				60					65					70				
10		ggt	cct	gga	aac	aca	cac	ctg	att	cag	ggg	ctt	tat	gat	tcg	cat	cga	593
		Gly	Pro	Gly	Asn	Thr	His	Leu	Ile	Gln	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	His	Arg	
			75					80					85					
15		aat	ggt	gcg	aag	gtg	ttg	gcc	atc	gct	agc	cat	att	ccg	agt	gcc	cag	641
		Asn	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Gln	
		90					95					100					105	
20		att	ggt	tcg	acg	ttc	ttc	cag	gaa	acg	cat	ccg	gag	att	ttg	ttt	aag	689
		Ile	Gly	Ser	Thr	Phe	Phe	Gln	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ile	Leu	Phe	Lys	
						110					115					120		
		gaa	tgc	tct	ggg	tac	tgc	gag	atg	gtg	aat	ggg	ggg	gag	cag	ggg	gaa	737
		Glu	Cys	Ser	Gly	Tyr	Cys	Glu	Met	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Gln	Gly	Glu	
					125					130					135			
25		cgc	att	ttg	cat	cac	gcg	att	cag	tcc	acc	atg	gcg	ggg	aaa	ggg	gtg	785
		Arg	Ile	Leu	His	His	Ala	Ile	Gln	Ser	Thr	Met	Ala	Gly	Lys	Gly	Val	
				140					145					150				
30		tcg	gtg	gta	gtg	att	cct	ggg	gat	atc	gct	aag	gaa	gac	gca	ggg	gac	833
		Ser	Val	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Asp	Ile	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	
			155					160					165					
35		ggt	act	tat	tcc	aat	tcc	act	att	tct	tct	ggc	act	cct	gtg	gtg	ttc	881
		Gly	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	
		170					175					180					185	
40		ccg	gat	cct	act	gag	gct	gca	gcg	ctg	gtg	gag	gcg	att	aac	aac	gct	929
		Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	
						190					195					200		
		aag	tct	gtc	act	ttg	ttc	tgc	ggg	gcg	ggc	gtg	aag	aat	gct	cgc	gcg	977
		Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	
					205					210					215			
45		cag	gtg	ttg	gag	ttg	gcg	gag	aag	att	aaa	tca	ccg	atc	ggg	cat	gcg	1025
		Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	
				220					225					230				
50		ctg	ggg	ggg	aag	cag	tac	atc	cag	cat	gag	aat	ccg	ttt	gag	gtc	ggc	1073
		Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	
			235					240					245					
55		atg	tct	ggc	ctg	ctt	ggg	tac	ggc	gcc	tgc	gtg	gat	gcg	tcc	aat	gag	1121
		Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	
		250					255					260					265	
		gcg	gat	ctg	ctg	att	cta	ttg	ggg	acg	gat	ttc	cct	tat	tct	gat	ttc	1169
		Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	
						270					275					280		

	ctt	cct	aaa	gac	aac	gtt	gcc	cag	gtg	gat	atc	aac	ggg	gcg	cac	att	1217
	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	
				285					290					295			
5	ggg	cga	cgt	acc	acg	gtg	aag	tat	ccg	gtg	acc	ggg	gat	gtt	gct	gca	1265
	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	
			300					305					310				
10	aca	atc	gaa	aat	att	ttg	cct	cat	gtg	aag	gaa	aaa	aca	gat	cgt	tcc	1313
	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro	His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	
		315					320					325					
15	ttc	ctt	gat	cgg	atg	ctc	aag	gca	cac	gag	cgt	aag	ttg	agc	tcg	gtg	1361
	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys	Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	
	330					335					340					345	
20	gta	gag	acg	tac	aca	cat	aac	gtc	gag	aag	cat	gtg	cct	att	cac	cct	1409
	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn	Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	
					350					355					360		
25	gaa	tac	gtt	gcc	tct	att	ttg	aac	gag	ctg	gcg	gat	aag	gat	gcg	gtg	1457
	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu	Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	
				365					370					375			
30	gag	aat	ccg	gag	gga	acg	cgc	gac	ttt	gtg	ggg	tca	ttc	cgc	cac	ggc	1553
	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	
		395					400					405					
35	acg	atg	gct	aat	gcg	ttg	cct	cat	gcg	att	ggg	gcg	caa	agt	gtt	gat	1601
	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	
	410					415					420					425	
40	cga	aac	cgc	cag	gtg	atc	gcg	atg	tgt	ggc	gat	ggg	ggg	ttg	ggc	atg	1649
	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	
				430						435					440		
45	ctg	ctg	ggg	gag	ctt	ctg	acc	gtt	aag	ctg	cac	caa	ctt	ccg	ctg	aag	1697
	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	
				445					450					455			
50	gct	gtg	gtg	ttt	aac	aac	agt	tct	ttg	ggc	atg	gtg	aag	ttg	gag	atg	1745
	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	
				460				465					470				
55	ctc	gtg	gag	gga	cag	cca	gaa	ttt	ggg	act	gac	cat	gag	gaa	gtg	aat	1793
	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	Phe	Gly	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Val	Asn	
				475			480					485					
60	ttc	gca	gag	att	gcg	gcg	gct	gcg	ggg	atc	aaa	tcg	gta	cgc	atc	acc	1841
	Phe	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Thr	
	490					495					500					505	
65	gat	ccg	aag	aaa	gtt	cgc	gag	cag	cta	gct	gag	gca	ttg	gca	tat	cct	1889
	Asp	Pro	Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Tyr	Pro	
					510					515					520		

gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg ctg tcg atc 1937
 Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile
 525 530 535

5

cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc aag gcg gcc 1985
 Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala
 540 545 550

10

acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc gat ctg gcc 2033
 Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala
 555 560 565

15

cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tgatgattga tacacctgct 2083
 Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro
 570 575

20

gttctcattg accgcgagcg cttaactgcc aacatttcca ggatggcagc tcacgccggt 2143
 gcccatgaga ttgcctt 2160

<210> 2
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

30

<400> 2
 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln
 1 5 10 15
 Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile
 20 25 30

35

Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn
 35 40 45
 Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly
 50 55 60

40

Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu
 65 70 75 80
 Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala
 85 90 95

45

Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln
 100 105 110

50

Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu
 115 120 125

55

Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile
 130 135 140
 Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly
 145 150 155 160

	Asp	Ile	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	
					165					170					175		
5	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	
				180					185					190			
	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	
			195					200					205				
10	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	
		210					215					220					
	Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	
	225					230					235					240	
15	Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	
					245					250					255		
20	Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	
				260					265					270			
	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	
			275					280					285				
25	Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	
		290					295					300					
	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro	
	305					310					315					320	
30	His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys	
					325					330					335		
35	Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn	
				340					345					350			
	Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu	
			355					360					365				
40	Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met	
		370					375					380					
	Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	
	385					390					395					400	
45	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	
					405					410					415		
	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	
50				420					425					430			
	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
			435					440					445				
55	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	
		450					455					460					
	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	
	465					470					475					480	

Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala
 485 490 495
 5 Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu
 500 505 510
 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
 515 520 525
 10 Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu
 530 535 540
 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly
 15 545 550 555 560
 Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile
 565 570 575
 20 Pro Thr Pro
 25 <210> 3
 <211> 875
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 30 <400> 3
 tgcgagatgg tgaatggtgg tgagcagggt gaacgcattt tgcattcacgc gattcagttcc 60
 accatggcgg gtaaagggtgt gtcggtggta gtgattcctg gtgatatcgc taaggaagac 120
 gcaggtgacg gtacttattc caattccact atttcttctg gcaactcctgt ggtgttcccg 180
 35 gatcctactg aggctgcagc gctggtggag gcgattaaca acgctaagtc tgtcactttg 240
 ttctgcggtg cgggcgtgaa gaatgctcgc gcgcagggtg tggagttggc ggagaagatt 300
 aatcaccga tcgggcatgc gctgggtggt aagcagtaca tccagcatga gaatccgttt 360
 gaggtcggca tgtctggcct gcttggttac ggcgcctgcg tggatgcgct caatgaggcg 420
 gatctgctga ttctattggg tacggatttc ccttattctg atttccttcc taaagacaac 480
 gttgcccagg tggatatcaa cgggtgcgcac attggtcgac gtaccacggt gaagtatccg 540
 40 gtgaccggtg atgttgctgc aacaatcgaa aatattttgc ctcatgtgaa ggaaaaaaca 600
 gatcgcttct tccttgatcg gatgctcaag gcacacgagc gtaagttgag ctcggtggtg 660
 gagacgtaca cacataacgt cgagaagcat gtgcctattc accctgaata cgttgccctct 720
 attttgaacg agctggcgga taaggatgcg gtgtttactg tggataccgg catgtgcaat 780
 gtgtggcatg cgaggtacat cgagaatccg gagggaacgc gcgactttgt gggttcattc 840
 45 cgccacggca cgatggctaa tgcgttgctc catgc 875
 <210> 4
 <211> 3248
 50 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> CDS
 55 <222> (802)..(2538)
 <400> 4
 gctctcgcag caacaagagc ccacgcagtt ggagcaaacg cagcaccaag tgaagcgatt 60

	ccgaaaatgc tcaagcccat gaggaacatc cgggcggtggc cgattttgtc acccaaagtg	120
	ccggtaccca aaagaaggcc cgccatgagc aggggatatg cgttgatgat ccacaacgct	180
5	tgggtttcgg tggctgcgag ctgttcacgc agcagaggga gtgcggtgta gagaatcgag	240
	ttgtctacac cgatcagaaa gagaccaccg ctgataacgg cgaggaaagc ccaacgttgg	300
10	gttttcgtag gcgcttgcg cgtgaagggt tctgaagtca tggatcgtaa ctgtaacgaa	360
	tggtcggtac agttacaact cttttgttgg tgttttagac cacggcgctg tgtggcgatt	420
	taagacgtcg gaaatcgtag gggactgtca gcgtgggtcg ggttctttga ggcgcttaga	480
15	ggcgattctg tgaggtcact ttttgtgggg tcgggggtcta aatttggcca gttttcgagg	540
	cgaccagaca ggcgtgcccc cgatgtttaa ataggcgatc ggtgggcatc tgtgtttggt	600
20	ttcgacgggc tgaaacccaa ccagactgcc cagcaacgac ggaaatccca aaagtgggca	660
	tccctgtttg gtaccgagta cccaccggg cctgaaactc cctggcaggc gggcgaagcg	720
	tggcaacaac tggaatttaa gagcacaatt gaagtcgcac caagttaggc aacacaatag	780
25	ccataacggt gaggagtcca g atg gca cac agc tac gca gaa caa tta att	831
	Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile	10
	1 5	
30	gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg ggt	879
	Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly	25
	15 20	
	gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att gag	927
35	Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu	40
	30 35	
	tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt gca gcc ggt gcg	975
	Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala	55
40	45 50	
	gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt ggt	1023
	Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly	70
	60 65	
45	cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga aat	1071
	Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn	90
	75 80 85 90	
50	ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag att	1119
	Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile	105
	95 100	
	ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag gaa	1167
55	Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu	120
	110 115	
	tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa cgc	1215
	Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg	135
	125 130 135	

	att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt aaa ggt gtg tcg	1263
	Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser	
	140 145 150	
5	gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac ggt	1311
	Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly	
	155 160 165 170	
10	act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc ccg	1359
	Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe Pro	
	175 180 185	
15	gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct aag	1407
	Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala Lys	
	190 195 200	
20	tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg cag	1455
	Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala Gln	
	205 210 215	
25	gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg ctg	1503
	Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala Leu	
	220 225 230	
30	ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc atg	1551
	Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly Met	
	235 240 245 250	
35	tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gcg tcc aat gag gcg	1599
	Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu Ala	
	255 260 265	
40	gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc ctt	1647
	Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe Leu	
	270 275 280	
45	cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gcg cac att ggt	1695
	Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile Gly	
	285 290 295	
50	cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca aca	1743
	Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala Thr	
	300 305 310	
55	atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc ttc	1791
	Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser Phe	
	315 320 325 330	
60	ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg gta	1839
	Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val Val	
	335 340 345	
65	gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct gaa	1887
	Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro Glu	
	350 355 360	
70	tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg ttt	1935
	Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val Phe	
	365 370 375	

	act	gtg	gat	acc	ggc	atg	tgc	aat	gtg	tgg	cat	gcg	agg	tac	atc	gag	1983
	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met	Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	
		380					385					390					
5	aat	ccg	gag	gga	acg	cgc	gac	ttt	gtg	ggt	tca	ttc	cgc	cac	ggc	acg	2031
	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	
	395					400					405				410		
10	atg	gct	aat	gcg	ttg	cct	cat	gcg	att	ggt	gcg	caa	agt	gtt	gat	cga	2079
	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	
					415					420					425		
15	aac	cgc	cag	gtg	atc	gcg	atg	tgt	ggc	gat	ggt	ggt	ttg	ggc	atg	ctg	2127
	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	
				430					435					440			
20	ctg	ggt	gag	ctt	ctg	acc	gtt	aag	ctg	cac	caa	ctt	ccg	ctg	aag	gct	2175
	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	
			445					450					455				
25	gtg	gtg	ttt	aac	aac	agt	tct	ttg	ggc	atg	gtg	aag	ttg	gag	atg	ctc	2223
	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	
		460					465					470					
30	gtg	gag	gga	cag	cca	gaa	ttt	ggt	act	gac	cat	gag	gaa	gtg	aat	ttc	2271
	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	Phe	Gly	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Val	Asn	Phe	
	475					480					485					490	
35	gca	gag	att	gcg	gcg	gct	gcg	ggt	atc	aaa	tcg	gta	cgc	atc	acc	gat	2319
	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Thr	Asp	
					495					500					505		
40	ccg	aag	aaa	gtt	cgc	gag	cag	cta	gct	gag	gca	ttg	gca	tat	cct	gga	2367
	Pro	Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Tyr	Pro	Gly	
				510					515					520			
45	cct	gta	ctg	atc	gat	atc	gtc	acg	gat	cct	aat	gcg	ctg	tcg	atc	cca	2415
	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Thr	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ile	Pro	
			525					530					535				
50	cca	acc	atc	acg	tgg	gaa	cag	gtc	atg	gga	ttc	agc	aag	gcg	gcc	acc	2463
	Pro	Thr	Ile	Thr	Trp	Glu	Gln	Val	Met	Gly	Phe	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	
		540					545					550					
55	cga	acc	gtc	ttt	ggt	gga	gga	gta	gga	gcg	atg	atc	gat	ctg	gcc	cgt	2511
	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Met	Ile	Asp	Leu	Ala	Arg	
	555					560				565						570	
60	tcg	aac	ata	agg	aat	att	cct	act	cca	tgatgattga	tacacctgct	</					

tttgccggcg caggtttttac ggacatcttt attgcatatc cgctgtatct aaccgatcat 2798
 5 gcagtgaac gcctgaacgc gatccccgga gaaattttcca ttggcgtgga ttcggtagag 2858
 atggcacagg cgacggcggg tttgcgggaa gatataaagg ctctgattga agtggattcg 2918
 ggacatcgta gaagtggagt cacggcgact gottcagaat tgagtcagat ccgcgaggcg 2978
 10 ctgggcagca ggtatgcagg agtgtttact tttcctgggc attcttatgg cccgggaaat 3038
 ggtgagcagg cagcagctga tgagcttcag gctctaaaca acagcgtcca ggcacttgct 3098
 15 ggccggcctga cttctggcgg ttcctcgccg tctgcgagcgt ttacagacgc aatcgatgag 3158
 atgcgaccag gcgtgtatgt gtttaacgat tcccagcaga tcacctcggg agcatgcact 3218
 gagaagcagg tggcaatgac ggtgctgtct 3248
 20
 <210> 5
 <211> 579
 <212> PRT.
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 25
 <400> 5
 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln
 1 5 10 15
 30 Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile
 20 25 30
 Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn
 35 35 40 45
 Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly
 50 55 60
 40 Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu
 65 70 75 80
 Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala
 85 90 95
 45 Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln
 100 105 110
 Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu
 115 120 125
 50 Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile
 130 135 140
 55 Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr
 165 170 175

	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	
				180					185					190			
5	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	
			195					200					205				
	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	
		210					215					220					
10	Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	
	225					230					235					240	
	Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	
					245					250					255		
15	Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	
				260					265					270			
20	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	
			275					280					285				
	Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	
		290					295					300					
25	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro	
	305					310					315					320	
	His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys	
					325					330					335		
30	Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn	
				340					345					350			
	Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu	
35			355					360					365				
	Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met	
		370					375					380					
40	Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	
	385					390					395					400	
	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	
					405					410					415		
45	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	
				420					425					430			
	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
50			435					440					445				
	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	
		450					455					460					
55	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	
	465					470					475					480	
	Phe	Gly	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	
					485					490					495		

Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu
500 505 510

5 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
515 520 525

Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu
530 535 540

10 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly
545 550 555 560

15 Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile
565 570 575

Pro Thr Pro

20

<210> 6
<211> 475
<212> DNA
25 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
gctctcgcag caacaagagc ccacgcagtt ggagcaaacg cagcaccaag tgaagcgatt 60
ccgaaaatgc tcaagcccat gaggaacatc cggcggtggc cgattttgtc acccaaagtg 120
30 ccggtaccca aaagaaggcc cgccatgagc aggggatatg cgttgatgat ccacaacgct 180
tgggtttcgg tggctgcgag ctgttcacgc agcagaggga gtgcggtgta gagaatcgag 240
ttgtctacac cgatcagaaa gagaccaccg ctgataacgg cgaggaaagc ccaacgttgg 300
gttttcgtag gcgcttgccg ctgtaagggt tctgaagtca tggatcgtaa ctgtaacgaa 360
tggtcggtag agttacaact cttttgttgg tgttttagac cacggcgctg tgtggcgatt 420
35 taagacgtcg gaaatcgtag gggactgtca gcgtgggtcg ggttctttga ggcgc 475

<210> 7
<211> 613
40 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7
gcgtccgcag gtgaaaacgc acaaaatcat tgaaattgcg cagatgcagg tcgacgccgg 60
45 tgcccagagg atcacctgcg caaccattgg cgaggcggaa atttttgccg gcgcagggtt 120
tacggacatc tttattgcat atccgctgta tctaaccgat catgcagtgc aacgcctgaa 180
cgcgatcccc ggagaaatct ccattggcgt ggattcggta gagatggcac aggcgacggc 240
gggtttgcgg gaagatatca aggctctgat tgaagtggat tcgggacatc gtagaagtgg 300
agtcacggcg actgcttcag aattgagtca gatccgcgag gcgctgggca gcaggatatgc 360
50 aggagtgttt acttttcctg ggcattctta tggcccggga aatggtgagc aggcagcagc 420
tgatgagctt caggctctaa acaacagcgt ccagcgactt gctggcggcc tgacttctgg 480
cggttcctcg ccgtctgcgc agtttacaga cgcaatcgat gagatgcgac caggcggtgta 540
tgtgtttaac gattcccagc agatcacctc gggagcatgc actgagaagc aggtggcaat 600
55 gacggtgctg tct 613

<210> 8
<211> 20
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz
 <220>
 5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pox-del1
 <400> 8
 atgaggaaca tccggcgggtg 20
 10
 <210> 9
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 15
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pox-del2
 20 <400> 9
 gagaacagca ggagtatcaa tcatactga actcctcaac gttatggc 48
 25
 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 30
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pox-del3
 <400> 10
 35 tgatgattga tacacctgct gttctc 26
 40
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pox-del4
 45
 <400> 11
 tcattgccac ctgcttctca 20
 50
 <210> 12
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1422)
 <223> Sequenz des delta poxB-Allels

<220>

<221> misc_feature

<222> (723)..(724)

<223> Deletion der Kodierregion des poxB-Gens

5

<400> 12

	atgaggaaca	tccggcgggtg	gccgattttg	tcacccaaag	tgccgggtacc	caaaagaagg	60
	cccgccatga	gcaggggata	tgcgttgatg	atccacaacg	cttgggtttc	ggtggctgcg	120
	agctgttcac	gcagcagagg	gagtgcgggtg	tagagaatcg	agttgtctac	accgatcaga	180
10	aagagaccac	cgctgataac	ggcgaggaaa	gcccaacgtt	gggttttcgt	aggcgcttgc	240
	gcctgtaagg	tttctgaagt	catggatcgt	aactgtaacg	aatggtcggt	acagttacaa	300
	ctcttttgtt	ggtgttttag	accacggcgc	tgtgtggcga	tttaagacgt	cggaaatcgt	360
	aggggactgt	cagcgtgggt	cgggttcttt	gaggcgctta	gaggcgattc	tgtgaggtca	420
	ctttttgtgg	ggtcggggtc	taaatttggc	cagttttcga	ggcgaccaga	caggcggtgcc	480
15	cacgatgttt	aaataggcga	tcggtgggca	tctgtgtttg	gtttcgacgg	gctgaaacca	540
	aaccagactg	cccagcaacg	acggaaatcc	caaaagtggg	catccctggt	tggtaccgag	600
	taccaccccg	ggcctgaaac	tccctggcag	gcggggcgaag	cgtggcaaca	actggaattt	660
	aagagcacia	ttgaagtcgc	accaagttag	gcaacacaat	agccataaag	ttgaggagtt	720
	cagtgatgat	tgatacacct	gctgttctca	ttgaccgcga	gcgcttaact	gccaacattt	780
20	ccaggatggc	agctcacgcc	ggtgcccatg	agattgccct	gcgtccgcac	gtgaaaacgc	840
	acaaaatcat	tgaaattgcy	cagatgcagg	tcgacgcccg	tgcccagagg	atcacctgcy	900
	caaccattgg	cgaggcggaa	atttttgccg	gcgcaggttt	tacggacatc	tttattgcat	960
	atccgctgta	tctaaccgat	catgcagtgc	aacgcctgaa	cgcgatcccc	ggagaaattt	1020
	ccattggcgt	ggattcggta	gagatggcac	aggcgacggc	gggtttgcgg	gaagatatca	1080
25	aggctctgat	tgaagtggat	tcgggacatc	gtagaagtgg	agtcacggcg	actgcttcag	1140
	aattgagtca	gatccgcgag	gcgctgggca	gcaggatatgc	aggagtgttt	acttttctctg	1200
	ggcattctta	tggcccggga	aatggtgagc	aggcagcagc	tgatgagctt	caggctctaa	1260
	acaacagcgt	ccagcgactt	gctggcggcc	tgacttctgg	cggttcctcg	ccgtctgcgc	1320
	agtttacaga	cgcaatcgat	gagatgcgac	caggcggtga	tgtgtttaac	gattcccagc	1380
30	agatcacctc	gggagcatgc	actgagaagc	agggtggcaat	ga		1422

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
5 durchführt:
 - a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen zumindest die für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB) abgeschwächt,
10 insbesondere ausgeschaltet wird;
 - b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
 - c) Isolierung der produzierten D-Pantothensäure.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Erzielung der Abschwächung das Verfahren der Insertion insbesondere mittels des Vektors pCR2.1poxBint, dargestellt in Figur 1 und hinterlegt in E. coli als DSM 13114, verwendet.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Erzielung der Abschwächung das Verfahren der Deletion insbesondere mittels des Vektors pCRB1-poxBdel dargestellt in Figur 2, verwendet.
- 25 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der D-Pantothensäure verstärkt.
- 30 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege

zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der D-Pantothensäure verringern.

6. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
5 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für
die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase kodierende
panB-Gen verstärkt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
10 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für
die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen
verstärkt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
15 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für
die Acetohydroxysäure Isomero-reduktase kodierende
ilvC-Gen verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
20 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für
die Dihydroxysäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen
verstärkt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 4, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
25 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für
die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-
Gen abschwächt.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 5 bis 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die genannten
30 Gene in coryneformen Bakterien verstärkt, die bereits
D-Pantothensäure produzieren.

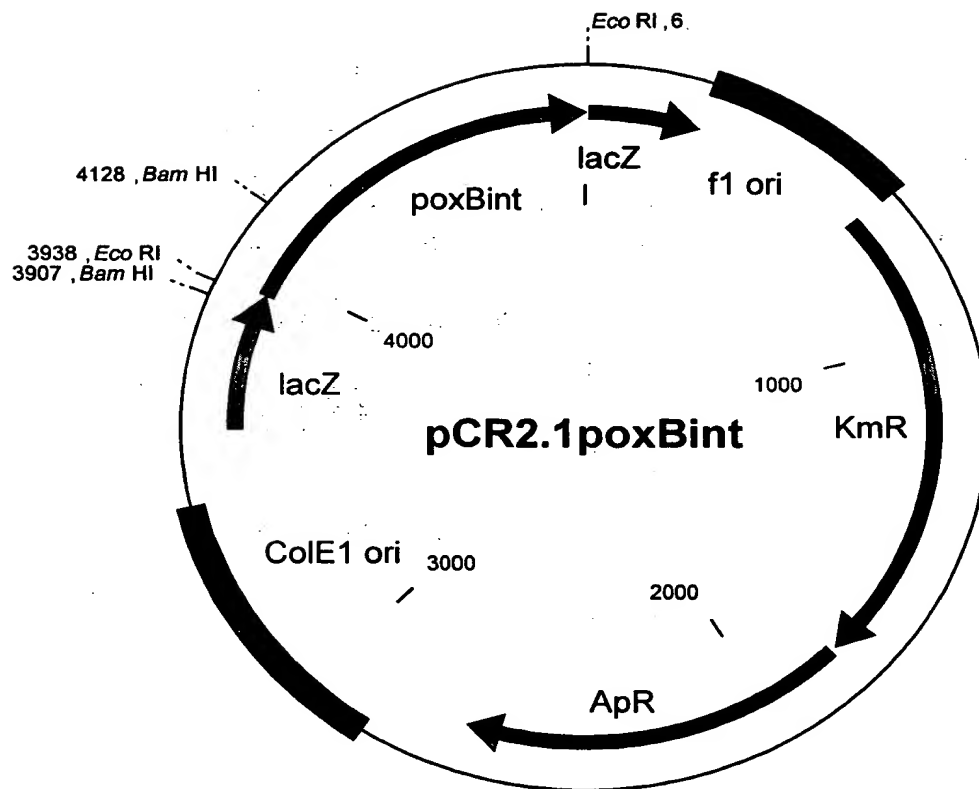
12. Verfahren gemäß den Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
Bakterien einsetzt die bereits D-Pantothensäure
produzieren, in denen man das pck Gen abschwächt.
- 5 13. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien
das stromaufwärts der SEQ ID No. 1 liegt, und in SEQ
ID No. 6 dargestellt ist.
- 10 14. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien
das stromabwärts der SEQ ID No. 1 liegt und in SEQ
ID No. 7 dargestellt ist.
- 15 15. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Deletionsmutation des poxB-Gens
dargestellt in SEQ ID No. 12.
16. Coryneforme Bakterien, die die in SEQ ID No. 12
dargestellte Deletionsmutation tragen.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation coryneformer Bakterien, bei dem man Bakterien einsetzt, in denen man die für die
5 Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB-Gen) abschwächt, wobei man folgende Schritte ausführt:

- 10
- a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden Bakterien, in denen zumindest das für Pyruvat-Oxidase kodierende Gen abgeschwächt wird;
 - b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
 - c) Isolieren der produzierten D-Pantothensäure.

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1poxBint



Figur 2:

